新疆地区亚洲玉米螟中 *Wolbachia* 共生菌的检测和鉴定

李 菁[1], 汪洋洲[2], 张小飞[3], 刘 津[1], 白明皓[1], 王振营[4,*]

(1. 西安文理学院生物与环境工程学院, 西安 710065; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 吉林公主岭 136100; 3. 西安市农业技术推广中心, 西安 710061; 4. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要: 【目的】探究我国新疆地区亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 种群中 *Wolbachia* 共生菌的感染情况,明确 *Wolbachia* 的感染类型及分布模式。【方法】对采集自新疆维吾尔自治区的 15 个亚洲玉米螟地理种群进行了 *Wolbachia* 感染率检测,并分别对感染个体中的 *wsp*, *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* 和 *fbpA* 6 个基因片段进行亚克隆和测序。分别利用 *wsp* 序列和多位点序列分型系统(multilocus sequence typing, MLST)对 *Wolbachia* 感染类群进行系统发育分析及分型分析。【结果】在 15 个供试亚洲玉米螟种群中,*Wolbachia* 感染率为 0 ~ 40.0%(5 个种群中未检测到感染个体),平均感染率为 11.1%。发现共感染了两种 *Wolbachia* 株系,分别命名为 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2,其中 *w*Ofur1 属于 A 大组,*w*Ofur2 属于 B 大组,分别对应 MLST 序列型为 ST352 和 ST37。在感染种群中,昌吉(CJ)、阜康(FK)、玛纳斯(MNS)和奇台(QT)4 个种群感染了 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2 两种株系,而在其余 6 个种群即和田(HT)、库尔勒(KEL)、莎车(SC)、疏勒(SL)、乌鲁木齐(UM)和新和(XH)中仅发现感染了 *w*Ofur2 株系,并在 MNS 种群中发现了超感染现象,*w*Ofur1 和 *w*Ofur2 两株系的平均感染率分别为 1.2% 和 10.3%。基于 *wsp* 序列及 MLST 等位基因谱系统发育分析表明 *w*Ofur2 株系与其他昆虫宿主中具有杀雄和诱导胞质不亲和作用的 *Wolbachia* 株系具有很近的亲缘关系。【结论】我国新疆地区亚洲玉米螟所感染的 *Wolbachia* 两种株系 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2 在亚洲玉米螟不同种群中的感染率和分布范围具有明显差异,*w*Ofur2 株系的感染率高于 *w*Ofur1 株系,且 *w*Ofur2 株系在亚洲玉米螟种群中分布更广。

关键词: 亚洲玉米螟; 地理种群; *Wolbachia*; 感染率; 系统发育分析

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)05-0555-10

Detection and identification of *Wolbachia* in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Xinjiang, northwestern China

LI Jing[1], WANG Yang-Zhou[2], ZHANG Xiao-Fei[3], LIU Jin[1], BAI Ming-Hao[1], WANG Zhen-Ying[4,*] (1. School of Biological and Environmental Engineering, Xi′an University, Xi′an 710065, China; 2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136100, China; 3. Xi′an Agricultural Technology Extension Center, Xi′an 710061, China; 4. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】 The objective of this study is to investigate the diversity and prevalence patterns of

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基础研究计划青年人才项目(2015JQ3091); 陕西省教育厅专项科研计划项目(15JK2146); 西安市科技计划创新基金文理专项(CXY1531WL28)

作者简介: 李菁, 女, 1983 年 2 月生, 河北石家庄市人, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫分子生态学, E-mail: jinglee211@xawl.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zywang@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2017-11-20; 接受日期 Accepted: 2018-01-12

Wolbachia in populations of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* in Xinjiang, northwestern China. 【Methods】 *Wolbachia* infection rates in 15 geographical populations of *O. furnacalis* collected from Xinjiang Uygur Autonomous Region were detected, and six genes including *wsp*, *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* and *fbpA* were subcloned and sequenced from each infected individual. Phylogenetic analysis and sequence typing of *Wolbachia* strains infecting *O. furnacalis* were performed based on *wsp* sequences and by multilocus sequence typing system (MLST), respectively. 【Results】 The *Wolbachia* infection rates in the 15 *O. furnacalis* populations ranged from 0 to 40.0%, with an average infection rate of 11.1% (no infected individual was detected in five populations). Phylogenetic trees based on *wsp* sequences and MLST allelic profiles indicated that two *Wolbachia* strains, *i. e.*, *w*Ofur1 and *w*Ofur2, infected *O. furnacalis* populations in Xinjiang, which were assigned to the supergroup A and supergroup B, corresponding to MLST sequence type ST352 and ST37, respectively. Among the tested populations, four populations, *i. e.*, populations from Changji (CJ), Fukang (FK), Manasi (MNS) and Qitai (QT), were infected with both strains, and six populations, *i. e.*, populations from Hotan (HT), Korla (KEL), Yarkant (SC), Shule (SL), Urumqi (UM) and Xinhe (XH), were only infected with *w*Ofur2. The average infection rates of *w*Ofur1 and *w*Ofur2 were 1.2% and 10.3%, respectively. Superinfection was found in MNS population tested. *wsp* and MLST clustering showed a closely genetic relationship between *w*Ofur2 and several *Wolbachia* strains which had been proved to induce cytoplasmic incompatibility and male-killing to their insect hosts. 【Conclusion】 The two *Wolbachia* strains *w*Ofur1 and *w*Ofur2 show distinct differences in the infection rate and prevalence pattern in *O. furnacalis* populations in Xinjiang. Infection with *w*Ofur2 is more frequent and widespread than that with *w*Ofur1 in *O. furnacalis* populations.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; geographical population; *Wolbachia*; infection rate; phylogenetic analysis

Wolbachia 属于细菌门(Bacteriophyta) α 变形菌纲(Alphaproteobacteria)的一类胞内共生菌,普遍侵染多种节肢动物和丝状线虫(Fenn and Blaxter, 2006)。据推测,在节肢动物门中有 52% 以上的物种感染有此类共生菌,在昆虫纲中的感染率在 20% ~ 76% (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Weinert *et al.*, 2015)。*Wolbachia* 在宿主中的传播方式主要依靠垂直传播(母系传播),此外也在多种昆虫中发现了 *Wolbachia* 在不同种宿主间发生水平传播的证据,如通过寄主-拟寄生物的纽带进行种间传播(Yang *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2016)。*Wolbachia* 具有如此广泛的寄主,在很大程度上依赖于它对宿主的生殖调控作用,使宿主产生一系列生殖异常,如诱导孤雌生殖 (parthenogenesis induction, PI)、胞质不亲和 (cytoplasmic incompatibility, CI)、基因型雄性的雌性化 (feminization) 和杀雄 (male-killing, MK) 等 (Werren *et al.*, 2008; Zug and Hammerstein, 2015)。

近年来研究发现,*Wolbachia* 对宿主的调控作用可能在宿主种群分化、物种形成和进化过程中发挥着重要作用,其中一个可能的机制是 CI 能够有效地阻止或减弱昆虫宿主不同种群间的基因交流。对分布在欧洲的牧草长沫蝉 *Philaenus spumarius* 种群进行线粒体谱系地理学分析发现,其地理种群可分为东北、西南两大支系 (lineage),这两个支系中 *Wolbachia* 感染率存在显著差异,研究者认为 *Wolbachia* 在其沫蝉宿主感染与未感染个体间造成了生殖屏障,加剧了沫蝉种群间的遗传分化(Lis *et al.*, 2015)。通过对截形叶螨 *Tetranychus truncatus* 线粒体细胞色素氧化酶 COI 基因和 *Wolbachia* 感染分析发现,感染个体中的遗传多样性显著低于未感染个体,且在叶螨种群中发现线粒体单倍型与 *Wolbachia* 感染情况呈显著相关,说明 *Wolbachia* 可以影响叶螨宿主种群的遗传结构及遗传多样性(Zhang *et al.*, 2013)。跳甲属 *Altica* (鞘翅目:叶甲科)内不同种叶甲分别感染了不同的 *Wolbachia* 类群,同域分布的具有特殊线粒体单倍型的个体均伴随感染对应的 *Wolbachia* 株系,并且发现 *w*LytA1 株系能够引起叶甲宿主种群性比失调,推测 *Wolbachia* 在该属叶甲物种形成与分化过程中发挥了重要作用(Jäckel *et al.*, 2013)。

Wolbachia 具有较高的遗传多样性，对 *Wolbachia* 的分类和命名常基于分子系统学分析。早期鉴定 *Wolbachia* 感染类群常依据 16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列进行分析和聚类（周孝贵等，2016）。根据这 3 种基因序列，在系统进化上 *Wolbachia* 被分为 A－H 8 个大组（supergroup），侵染昆虫纲的多属于 A 组和 B 组（Werren *et al.*，1995）。由于 *wsp* 基因（编码外膜蛋白）的进化速度快，具有很高的序列多态性，基于 *wsp* 序列曾建立起一套较为完善的 *Wolbachia* 分类系统（Zhou *et al.*，1998；van Meer *et al.*，1999）。但由于 *Wolbachia* 的基因组内具有很高的重组率，应用单一基因的序列信息不能全面反映 *Wolbachia* 类群之间的系统进化关系（Baldo *et al.*，2006a；Baldo and Werren，2007）。为此，Baldo 等（2006b）提出了更为严谨的 *Wolbachia* 标准分型体系，即多位点序列分型系统（multilocus sequence typing，MLST）。该系统综合了 *Wolbachia* 中普遍存在的 5 个看家基因的序列信息，包括 *gatB*（谷氨酰胺转移酶 B 亚基基因）、*hcpA*（保守假定蛋白基因）、*coxA*（细胞色素 C 氧化酶 I 亚基基因）、*ftsZ*（细胞分裂蛋白基因）和 *fbpA*（果糖二磷酸醛缩酶基因），并建立了专门的数据库（*Wobachia* MLST Databases：https：//pubmlst. org/wolbachia/），用于对 *Wolbachia* 进行鉴定、分型及系统聚类分析（Baldo *et al.*，2006b）。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（Guenée）属于鳞翅目（Lepidoptera）草螟科（Crambidae）秆野螟属 *Ostrinia*，在我国各玉米产区均有分布，是为害玉米的主要害虫之一，给我国玉米生产带来严重损失。关于亚洲玉米螟中感染共生菌 *Wolbachia* 的研究可追溯到 20 世纪 90 年代，最先在日本亚洲玉米螟种群中发现存在性比雌性偏向现象，且这种性比偏雌性在群体中可遗传，由一种 *Wolbachia* 株系感染所导致，感染该株系的基因型雄性个体发生雌性化，而且感染该株系的雌性个体其后代均为雌性（Kageyama *et al.*，1998，2002；Sakamoto *et al.*，2007）。之后又在秆野螟属内的几个近缘种包括豆秆野螟 *O. scapulalis*、苍耳螟 *O. orientalis* 和款冬螟 *O. zaguliaevi* 群体中也发现了类似的性比偏雌性现象，并且也是由感染相同株系的 *Wolbachia* 所致（Kageyama *et al.*，2003a，2003b，2004）。

新疆是我国陆地面积第一大省区，地处欧亚大陆中心，境内山脉与盆地相间排列，横亘于中部的天山山脉把新疆分为南北两半（南疆和北疆）。由于我国新疆地区特殊的生态地理环境，使该地区的玉米种植带呈斑块状分布（王永兴，2002；吕新等，2005）。以玉米为主要寄主植物的亚洲玉米螟由于受到山脉及荒漠等地理因素的阻隔，造成南北种群间基因交流困难，地理隔离效应显著。新疆伊犁地区是典型的亚洲玉米螟与欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*（Hübner）的混生区，已有研究表明，该地区的亚洲玉米螟和欧洲玉米螟两物种间正在发生基因渗入（introgression），已形成一定比例的“中间种”（Wang *et al.*，2017）。新疆地区分布的亚洲玉米螟种群，由于玉米带之间的地理隔离特性以及处于亚洲玉米螟和欧洲玉米螟混生区的独特性，是研究亚洲玉米螟种群分化及亚洲玉米螟和欧洲玉米螟近缘种形成与演化的理想实验材料。

据报道，我国亚洲玉米螟种群感染 *Wolbachia* 类群非常丰富，以 *wsp* 基因序列为基础的分类系统上共发现感染了 9 种 *Wolbachia* 株系（Li *et al.*，2013）。迄今为止，尚未见利用 MLST 系统对亚洲玉米螟感染 *Wolbachia* 株系进行鉴定和分析的研究报道，且 *Wolbachia* 在对亚洲玉米螟种群分化和物种形成中发挥了怎样的作用目前尚未得知。本研究对采集自我国新疆地区的 15 个亚洲玉米螟地理种群进行 *Wolbachia* 感染检测，并对感染的株系利用 MLST 系统进行鉴定和分型，以明确 *Wolbachia* 在我国新疆地区亚洲玉米螟群体中的分布和类型。本研究结果将有助于揭示 *Wolbachia* 在亚洲玉米螟中的传播扩散规律，并为分析其与该害虫之间的进化关系提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

本试验供试亚洲玉米螟种群于 2014－2015 年间采自新疆维吾尔自治区 15 个地区的玉米田中，采集虫态均为 4－5 龄幼虫。各种群样本量、采集地点分布详情如表 1 所示。采回后单头幼虫置于离心管－80℃保存至 DNA 提取。

1.2　基因组 DNA 提取

单头幼虫置于 2 mL 无菌离心管中，使用 Tissue Lyser Ⅱ自动组织破碎仪（QIAGEN，德国）进行虫体研磨和匀浆，使用血液/组织/细胞基因组提取试剂盒（TIANGEN，中国）提取基因组 DNA。DNA 样品通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取质量，并用 NanoDrop 微量核酸/蛋白检测仪（Thermo，美国）测

定各 DNA 样品的浓度及纯度,检测合格后 DNA 保存于 -20℃备用。

1.3 *Wolbachia* 感染率检测

为避免 PCR 扩增过程中假阴性和假阳性对检测结果的干扰,分别采用 16S rRNA, *ftsZ* 和 *wsp* 3 个基因对 *Wolbachia* 感染率进行检测(O′Neill *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998)。以确定感染 *Wolbachia* 的亚洲玉米螟 DNA 样本作为阳性对照,以 ddH_2O 代替模板 DNA 作为阴性对照。PCR 引物及退火温度如表 2 所示。

表 1 新疆亚洲玉米螟地理种群样品采集信息及 *Wolbachia* 感染率

Table 1 Sampling information and the *Wolbachia* infection rate of different geographical populations of *Ostrinia furnacalis* in Xinjiang

序号 No.	采集地点 Sampling location	种群代码 Population code	地理坐标 Geo-coordinates	采集时间(年-月) Collection date (year-month)	样本数 Sample size	感染个体数 Number of infected individuals	感染率(%) Infection rate
1	察布查尔 Chabuchar	CB	43.21°N, 81.26°E	2015-08	29	0	0
2	昌吉 Changji	CJ	44.76°N, 87.18°E	2014-08	51	7	13.7
3	阜康 Fukang	FK	44.09°N, 87.58°E	2014-08	45	2	4.4
4	霍城 Huocheng	HC	43.71°N, 80.44°E	2015-08	30	0	0
5	和田 Hotan	HT	37.26°N, 80.32°E	2015-07	36	5	13.9
6	库尔勒 Korla	KEL	42.16°N, 86.05°E	2015-08	33	4	12.1
7	玛纳斯 Manasi	MNS	44.76°N, 86.18°E	2015-08	32	5	15.6
8	尼勒克 Nilka	NLK	43.45°N, 82.16°E	2015-08	35	0	0
9	奇台 Qitai	QT	44.65°N, 90.64°E	2015-08	38	2	5.3
10	莎车 Yarkant	SC	38.58°N, 77.21°E	2015-07	35	14	40.0
11	疏勒 Shule	SL	38.68°N, 75.82°E	2015-07	30	8	26.7
12	乌鲁木齐 Urumqi	UM	44.32°N, 88.37°E	2015-08	34	6	17.7
13	新和 Xinhe	XH	40.85°N, 82.13°E	2015-08	28	4	14.3
14	新源 Xinyuan	XY	43.62°N, 83.86°E	2015-08	30	0	0
15	伊宁 Yining	YN	43.92°N, 80.25°E	2015-08	29	0	0

表 2 引物信息

Table 2 Primer information

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequence	退火温度(℃) Tm	产物长度(bp) Product size	用途 Purpose
16S_F	CATACCTATTCGAAGGGATAG	51	440	*Wolbachia* 感染检测 *Wolbachia* infection detection
16S_R	AGCTTCGAGTGAAACCAATTA			
ftsZ_F	GTTGTCGCAAATACCGATGC	55	1 043 - 1 055	
ftsZ_R	CTTAAGTAAGCTGGTATATC			
wsp81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	55	580 - 632	
wsp691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA			
gatB_F1	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	54	471	多位点序列分型系统看家基因扩增 Amplification of housekeeping genes from multilocus sequence typing (MLST)
gatB_R1	TGGYAAYTCRGGYAAAGATGA			
coxA_F1	TTGGRGCRATYAACTTTATAG	54	487	
coxA_R1	CTAAAGACTTTKACRCCAGT			
hcpA_F1	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	54	515	
hcpA_R1	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG			
ftsZ_F1	ATYATGGARCATATAAARGATAG	54	524	
ftsZ_R1	TCRAGYAATGGATTRGATAT			
fbpA_F1	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	59	509	
fbpA_R1	CCRCCAGARAAAAYYACTATTC			

PCR 反应体系(20 μL)：2 × Taq PCR MasterMix 10 μL，正/反向引物(10 mmol/L)各 1 μL，DNA 模板 1 μL 及 ddH_2O 7 μL(TIANGEN，中国)。PCR 扩增程序：95℃ 预变性 3 min；95℃ 30 s，Tm 退火 1 min，72℃延伸 1 min，35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。反应结束后，取 5 μL PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测，电泳检测结果在 UVP Biodoc-IT220凝胶成像系统中观察并拍照记录。

1.4　感染个体中 *Wolbachia* MLST 序列分型及 *wsp* 序列分析

在确定感染 *Wolbachia* 的亚洲玉米螟个体中分别扩增 *gatB*，*hcpA*，*coxA*，*ftsZ*，*fbpA* 及 *wsp* 6 个基因片段(Baldo *et al.*，2006b；Baldo and Werren，2007；Simões *et al.*，2011)。PCR 反应体系(50 μL)：2 × Taq PCR MasterMix 25 μL，正/反向引物(10 mmol/L)各 2 μL，DNA 模板 2 μL 及 ddH_2O 19 μL(TIANGEN，中国)。反应条件同 1.3 节，引物序列及退火温度见表 2。将目的片段分别在紫外灯下进行切胶，用凝胶回收试剂盒进行纯化回收，与 pGEM-T 载体(TIANGEN)于 4℃下连接过夜。将连接产物转化至感受态大肠杆菌 *Escherichia coli* 中，通过蓝白斑筛选，每个感染个体每个基因随机挑选 5 ~6个阳性克隆，经菌液 PCR 鉴定含有目的片段后，交由公司进行双向序列测定（生工生物工程股份有限公司）。

将测序后得到的序列首先利用 DNAMAN 软件进行初步整理，去除两端的载体序列。将整理后的序列在 NCBI 网站中进行同源性搜索(Nucleotide BLAST)，(http：// blast. ncbi. nlm. nih. gov/Blast. cgi)，确定所得序列为目的基因序列后，将测序结果全部提交到 PubMLST 数据库，获得由各等位基因编号组成的 MLST 等位基因谱和 WSP 的基因谱，得到感染 *Wolbachia* 的序列型(ST)。选取 PubMLST 数据库中具代表性的 *Wolbachia* 株系(所选株系均对其昆虫宿主具有一定的生殖调控作用)，连同本研究所得亚洲玉米螟中感染的 *Wolbachia* 株系，利用 MEGA v. 6.06 软件分别依据 *wsp* 序列和 MLST 等位基因谱构建最大似然法(maximum likelihood，ML)系统发育树，采取 Kimura 2-Parameter 模型计算遗传距离，位点间变异率采用 G 位点间变化的离散 Gamma 分布，其他参数设置为默认值，检验支持率的重复性抽样分析(bootstrap analysis)参数设置为 1 000 次。

2　结果

2.1　新疆亚洲玉米螟种群 *Wolbachia* 感染率

在采集的 15 个地理种群共 515 头亚洲玉米螟幼虫中，共检测到 57 头个体感染了 *Wolbachia*。各种群中 *Wolbachia* 感染率在 0 ~40.0% 不等，不同种群中感染率差异较大，平均感染率为 11.1%(表 1)。有 5 个种群未检测到感染个体，占供试种群的 1/3。在感染种群中，除阜康(FK)和奇台(QT)两个种群的感染率较低以外(4% ~5% 左右)，其他种群的 *Wolbachia* 感染率均在 10% 以上，其中莎车(SC)种群的感染率最高，达 40.0%。

2.2　基于 *wsp* 基因的 *Wolbachia* 系统发育分析

在检测到感染的 10 个种群共 57 头亚洲玉米螟感染个体中，基于 *wsp* 基因片段序列比对和分析，共发现感染了两种 *Wolbachia* 株系，对应片段长度分别为 602 和 599 bp，分别命名为 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2，两株系 *wsp* 基因的序列相似度为 78.7%，遗传距离为 0.218。*w*Ofur1 和 *w*Ofur2 分别与 GenBank 中登录的 *w*Fur1(GU166588)和 *w*Fur9(GU166596)序列完全一致。在感染种群中，*w*Ofur1 和 *w*Ofur2 在昌吉(CJ)、阜康(FK)、玛纳斯(MNS)和奇台(QT)4 个种群中均有感染，而在其余 6 个种群中仅发现感染了 *w*Ofur2 株系。在所有感染的亚洲玉米螟个体中，有 4 头个体感染了 *w*Ofur1 株系，51 头个体感染了 *w*Ofur2 株系，并在 MNS 种群的两头个体中发现存在 *Wolbachia* 的超感染现象，即同一头亚洲玉米螟个体中同时感染了 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2 两种共生菌(图 1)。*w*Ofur1 和 *w*Ofur2 两株系在所有供试种群中的平均感染率分别为 1.2% 和 10.3%。从种群地域分布来看，南疆地区种群(包括和田、库尔勒、莎车、疏勒和新和 5 个种群) *Wolbachia* 总体感染率为 21.60%，而北疆地区种群(其余 10 个供试种群)总体感染率仅为 6.23%，南疆和北疆地区 *Wolbachia* 总体感染率表现出明显差异。

系统发育分析结果显示，*w*Ofur1 和 *w*Ofur2 分属于 A 大组和 B 大组，*w*Ofur1 与掠蝇金小蜂 *Muscidifurax uniraptor* 中感染的 *w*Uni 株系聚为一个分支，同属于 A 大组 Uni 组；而 *w*Ofur2 与灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中感染的 *w*Stri 株系和杂拟谷盗 *Tribolium confusum* 中感染的 *w*Con 株系聚为一个分支，同属于 B 大组 Con 组(图 2)。

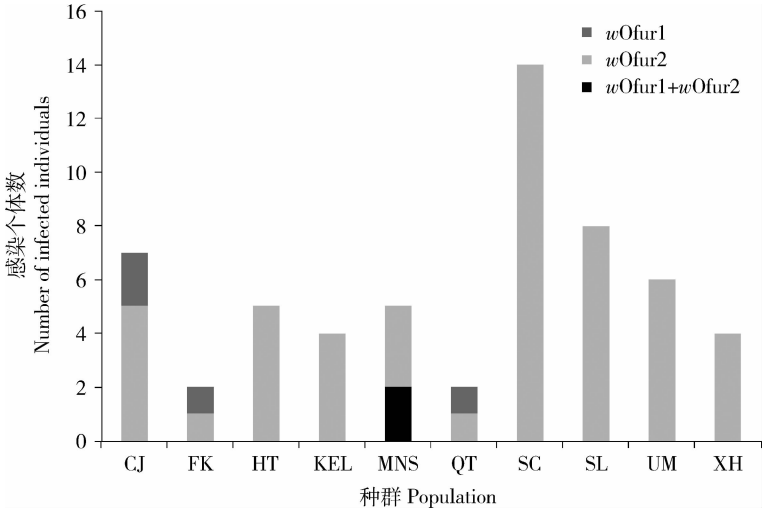


图 1 *Wolbachia* 株系 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2 在供试新疆亚洲玉米螟种群中的分布情况

Fig. 1 Prevalence of *w*Ofur1 and *w*Ofur2 strains of *Wolbachia* among *Ostrinia furnacalis* populations in Xinjiang

种群代码同表 1。Population codes same as those in Table 1.

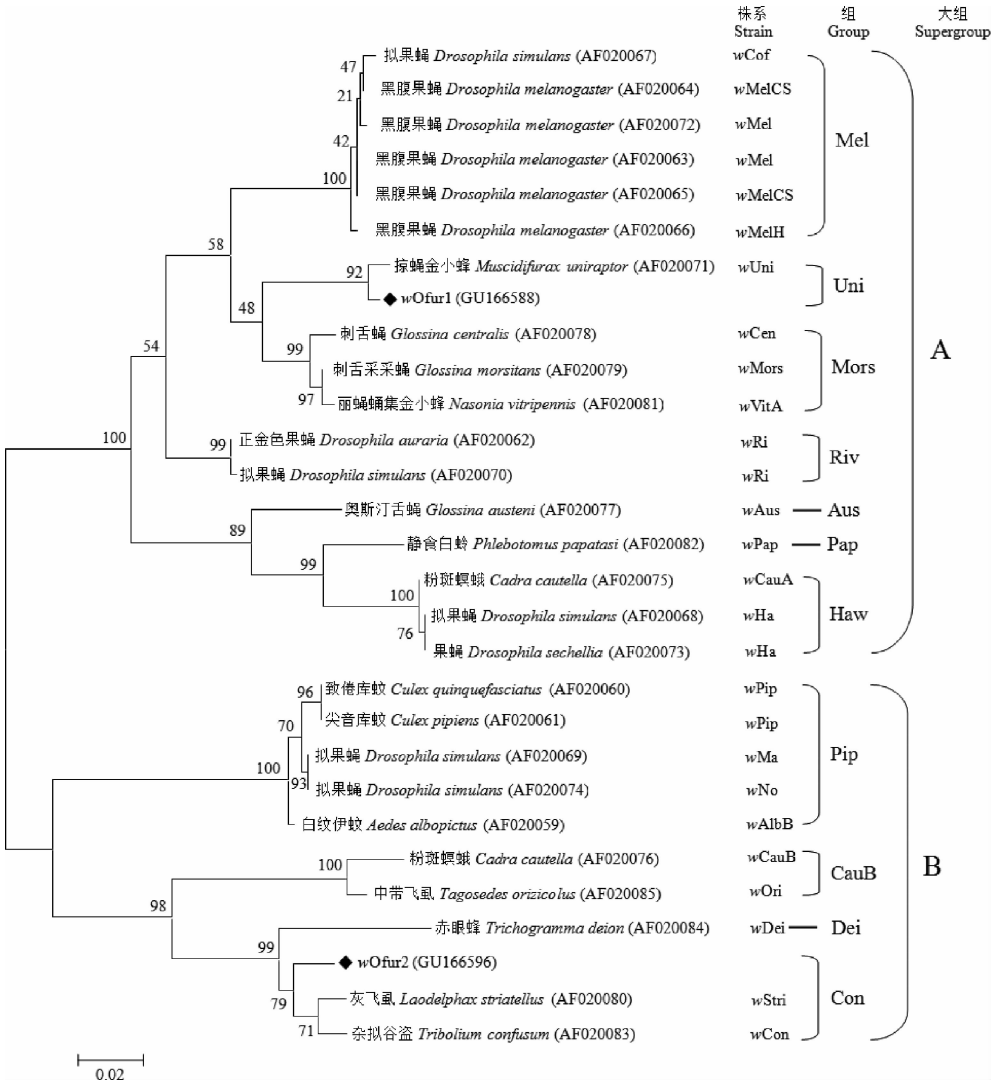


图 2 基于 *wsp* 基因核苷酸序列构建的 *Wolbachia* 系统发育树(最大似然法)

Fig. 2 Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of *wsp* gene generated by maximum likelihood (ML) algorithm

2.3　基于 MLST 的 *Wolbachia* 株系分型及系统发育分析

MLST 分析显示 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2 株系分别对应 2 种序列型(sequence type, ST)——ST352 和 ST37,各看家基因和 *wsp* 基因对应的等位基因编号如表 3 所示。由 ML 系统发育树可见,30 个株系共分为两大分支,即 A 大组和 B 大组。在 A 组中,亚洲玉米螟感染的 *w*Ofur1 株系与掠蝇金小蜂 *M. uniraptor* 中感染的 Muni 株系(ST23)和黑缘豆粉蝶 *Colias palaeno* 中感染的 Cpal 株系(ST352)聚为一支;在 B 组中,*w*Ofur2 株系与豆秆野螟 *O. scapulalis* 中感染的 Osca 株系(ST27)和造纸胡蜂 *Polistes dominula* 中感染的 Pdom 株系(ST37)聚为一支;系统树各分支 Bootstrap 置信度均在 50% 以上(图 3)。*w*Ofur2 株系与其他昆虫宿主中具有杀雄和诱导胞质不亲和作用的 *Wolbachia* 株系具有很近的亲缘关系。

表 3　亚洲玉米螟中 *Wolbachia* 株系的 MLST 等位基因谱及序列型

Table 3　MLST allelic profiles and sequence types (ST) of *Wolbachia* strains detected from *Ostrinia furnacalis*

Wolbachia 株系 *Wolbachia* strain	看家基因 Housekeeping genes					序列型 Sequence type	*wsp*
	gatB	*coxA*	*hcpA*	*ftsZ*	*fbpA*		
*w*Ofur1	8	7	8/198	6	1	ST352	700
*w*Ofur2	9	9	6	8	10	ST37	63

表中各基因下对应的数字为 PubMLST 数据库中对应的等位基因编号。The number below each allelic gene indicates the allele number in PubMLST database.

3　结论与讨论

本研究对我国新疆地区 15 个亚洲玉米螟种群进行了 *Wolbachia* 感染检测,在其中 10 个种群中检测到了该种共生菌的感染,*Wolbachia* 平均感染率为 11.1%,在感染个体中共检测到两种 *Wolbachia* 株系,其中 *w*Ofur1 株系属于 A 大组,在 MLST 分型系统中的序列型为 ST352,*w*Ofur2 株系属于 B 大组,在 MLST 分型系统中的序列型为 ST37。在感染种群中,*w*Ofur1 和 *w*Ofur2 在昌吉(CJ)、阜康(FK)、玛纳斯(MNS)和奇台(QT)4 个种群中均有感染,而在其余 6 个种群中仅发现感染了 *w*Ofur2 株系,相对于 *w*Ofur1 而言,*w*Ofur2 在新疆地区亚洲玉米螟中的侵染分布更广。此外在所有检测种群中,仅在玛纳斯种群的两头玉米螟个体中发现存在 *Wolbachia* 的超感染现象(即同时感染了 *w*Ofur1 和 *w*Ofur2 两株系),说明两种 *Wolbachia* 共生菌在该地区亚洲玉米螟中主要以单独侵染为主。

Wolbachia 在寄主种群中随着寄主的扩散、迁移和基因交流得以传播,且不同株系的感染率和侵染范围与其在寄主中所引起的适合度代价、寄主对共生菌的生理抗性、株系之间的竞争作用、垂直传播效率以及对寄主产生的生殖调控作用等多种因素相关(Fleury *et al.*, 2000; Koehncke *et al.*, 2009; Duplouy *et al.*, 2015)。据推测,具有杀雄作用的 *Wolbachia* 株系在宿主中的感染率通常低于具有诱导胞质不亲和的 *Wolbachia* 感染率(Hilgenboecker *et al.*, 2008)。本研究 MLST 分型系统和 *wsp* 基因系统发育分析结果表明,感染亚洲玉米螟 A 组的 *w*Ofur1 株系与掠蝇金小蜂 *M. uniraptor* 中感染的具有诱导宿主发生孤雌生殖的 Muni 株系亲缘关系较近,而 B 组的 *w*Ofur2 株系与豆秆野螟 *O. scapulalis* 中感染的 Osca 株系和造纸胡蜂 *P. dominula* 中感染的 Pdom 株系亲缘关系最近。据报道,这两种株系分别对昆虫宿主具有杀雄和诱导胞质不亲和的作用(Baldo *et al.*, 2006b)。根据 *wsp* 序列比对发现本研究中 *w*Ofur2 株系与之前报道的日本亚洲玉米螟种群中感染的 *Wolbachia* 属于同一株系,该株系具有诱导基因型雄性个体雌性化并使感染个体只产生雌性后代的生殖效应(Kageyama *et al.*, 2002)。本研究发现,侵染新疆地区亚洲玉米螟的两种 *Wolbachia* 株系分布频率存在明显差异,其中 *w*Ofur2 的平均感染率为 10.3% 而 *w*Ofur1 的平均感染率仅为 1.2%,且 *w*Ofur1 的分布范围小于 *w*Ofur2 株系。据此推测 *w*Ofur2 株系因具有对寄主的生殖调控作用或使寄主具有更高的适合度,有利于其在寄主中更广泛地分布与传播。除诱导寄主雌性化和产雌生殖以外,*w*Ofur1 和 *w*Ofur2 株系是否在亚洲玉米螟寄主中还具有其他形式的生殖调控作用,至今还尚未得知。

Wolbachia 在新疆地区亚洲玉米螟中的分布和感染频率具有一定的地域差异,表现为北疆地区种群整体感染率较低,而南疆地区种群感染率较高。造成不同地区 *Wolbachia* 感染率差异的原因,可能与不同气候条件下亚洲玉米螟寄主具有不同的发育历期和发生代数相关(阿依克孜等, 2017),并且由于新疆境内山脉与荒漠等地理因素,造成分布在南疆和北疆的亚洲玉米螟种群之间基因交流受到阻碍。在本研究中,新疆西北部伊犁州的 5 个种群(包括察布查尔、霍城、尼勒克、新源和伊宁)均未检测到

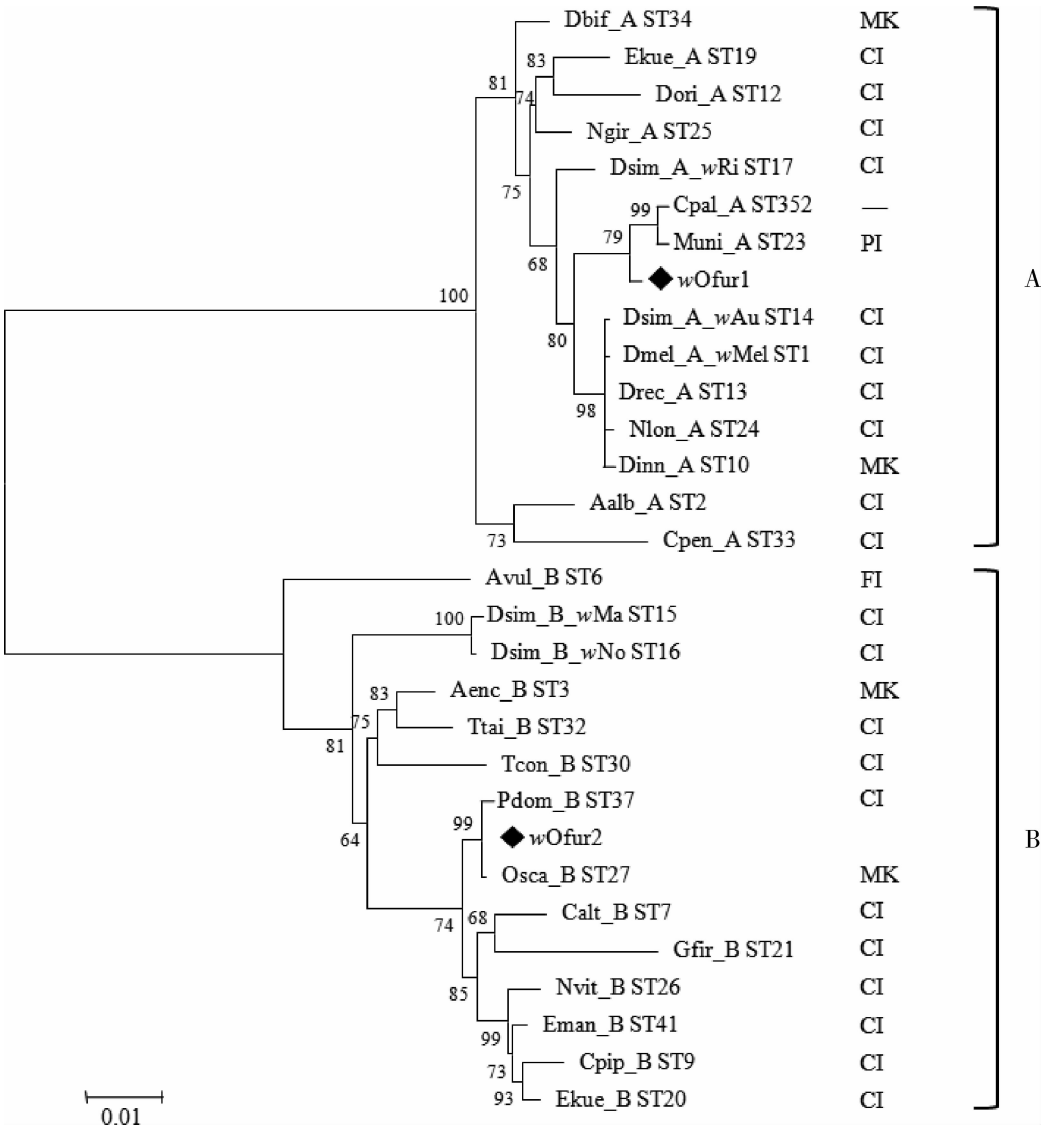


图 3 基于 MLST 等位基因谱构建的 *Wolbachia* 系统发育树(最大似然法)

Fig. 3 Phylogenetic tree based on *Wolbachia* MLST allelic profiles generated by maximum likelihood (ML) algorithm

Dbif_A ST34: *Drosophila bifasciata*; Ekue_A ST19: 地中海粉螟 *Ephestia kuehniella*; Dori_A ST12: *Drosophila orientacea*; Ngir_A ST25: 金小蜂 *Nasonia giraulti*; Dsim_A_*w*Ri ST17: 拟果蝇 *Drosophila simulans*; Cpal_A ST352: 黑缘豆粉蝶 *Colias palaeno*; Muni_A ST23: 掠蝇金小蜂 *Muscidifurax uniraptor*; Dsim_A_*w*Au ST14: 拟果蝇 *Drosophila simulans*; Dmel_A_*w*Mel ST1: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; Drec_A ST13: *Drosophila recens*; Nlon_A ST24: 长角金小蜂 *Nasonia longicornis*; Dinn_A ST10: *Drosophila innubila*; Aalb_A ST2: 白纹伊蚊 *Aedes albopictus*; Cpen_A ST33: 宾州弓背蚁 *Camponotus pennsylvanicus*; Avul_B ST6: 鼠妇 *Armadillidium vulgare*; Dsim_B_*w*Ma ST15: 拟果蝇 *Drosophila simulans*; Dsim_B_*w*No ST16: 拟果蝇 *Drosophila simulans*; Aenc_B ST3: 非洲细蝶 *Acraea encedon*; Ttai_B ST32: 台湾油葫芦 *Teleogryllus taiwanemma*; Tcon_B ST30: 杂拟谷盗 *Tribolium confusum*; Pdom_B ST37: 造纸胡蜂 *Polistes dominulus*; Osca_B ST27: 豆秆野螟 *Ostrinia scapulalis*; Calt_B ST7: *Chelymorpha alternans*; Gfir_B ST21: 黑蟋蟀 *Gryllus firmus*; Nvit_B ST26: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*; Eman_B ST41: 黄粉蝶 *Eurema mandarina*; Cpip_B ST9: 尖音库蚊 *Culex pipiens*; Ekue_B ST20: 地中海粉螟 *Ephestia kuehniella*. CI: 诱导胞质不亲和 Cytoplasmic incompatibility; PI: 诱导孤雌生殖 Parthenogenesis induction; MK: 诱导杀雄 Male killing; FI: 诱导雌性化 Feminization induction. 标尺示遗传距离;各分支标记为 *Wolbachia* 株系名称、所属大组及序列型。The scale bar indicates the genetic distance. Strain name, supergroup (A, B) and sequence type (ST) are marked on each branch.

感染个体。该区域在 20 世纪 80 年代中期以前为欧洲玉米螟 *O. nubilalis* 纯生区(周大荣等, 1988),而近 30 年来亚洲玉米螟已成功入侵并逐渐成为该区域玉米螟的优势种。同域分布的亚洲玉米螟和欧洲玉米螟处于相同的生态位,享有共同的寄主植物资源,而亚洲玉米螟在与欧洲玉米螟的竞争中逐渐占据优势,说明相同环境下亚洲玉米螟具有更高的适合度。本研究结果表明,此区域亚洲玉米螟种群 *Wolbachia* 感染率极低,说明 *Wolbachia* 在该区域亚洲玉米螟群体中的传播受到了阻力。

在生物进化的历史进程中由于可能发生过种间的基因渗入或地理分隔，都可能导致物种内线粒体基因序列存在深度的分化和变异（Munoz *et al.*，2011）。在进化过程中，母系遗传的共生菌常通过对寄主的生殖调控策略，提高其能够传播到下一代的几率，而导致寄主种群线粒体基因单倍型频率的改变。由于 *Wolbachia* 侵染可能会在寄主种群中感染个体与非感染个体之间造成生殖隔离，有效阻止或减弱了寄主种群之间的基因交流，经过长期发展可能会促进寄主种群内或种群间产生进一步的遗传分化，甚至最终分化形成新的物种（Smith *et al.*，2012；Ritter *et al.*，2013）。最新研究发现，新疆伊犁地区的亚洲玉米螟和欧洲玉米螟近缘种之间正在发生基因渗入现象，产生了一定比例的杂交种，即发现通过母系遗传的线粒体基因和两性遗传的核基因来自于两个物种（Wang *et al.*，2017）。亚洲玉米螟种群中普遍感染有 *Wolbachia*（Li *et al.*，2013），而至今未在欧洲玉米螟中检测到 *Wolbachia* 的感染。已知地理隔离（亚洲玉米螟和欧洲玉米螟在世界范围内各自具有不同的分布范围）和性信息素组分的差异是亚洲玉米螟和欧洲玉米螟之间维系生殖隔离的主要因素（Wang *et al.*，2017）。伊犁州亚洲玉米螟和欧洲玉米螟混生区未发现 *Wolbachia* 感染，推测 *Wolbachia* 在两种玉米螟发生基因渗入的过程中逐渐丢失，或感染个体因在亚洲玉米螟和欧洲玉米螟共生环境中具有某种适合度劣势而被逐渐淘汰。为此，不同 *Wolbachia* 株系的感染对亚洲玉米螟及欧洲玉米螟个体适合度会产生何种影响还需进一步深入研究。迄今为止，*Wolbachia* 在亚洲玉米螟和欧洲玉米螟物种分化过程中发挥了何种作用仍然未知，且亚洲玉米螟中感染的 *Wolbachia* 是否会通过诱导寄主的胞质不亲和作用而加强其与欧洲玉米螟之间的生殖隔离效应，仍需进一步研究。此外，在今后的研究中，还需进一步结合亚洲玉米螟线粒体基因来分析 *Wolbachia* 感染是否具有促进亚洲玉米螟种群间产生遗传分化的效应。

致谢　感谢新疆农业科学院微生物应用研究所的郭文超研究员在供试样品采集过程中给予的支持和帮助。

参考文献（References）

Ahmed MZ, Breinholt JW, Kawahara AY, 2016. Evidence for common horizontal transmission of *Wolbachia* among butterflies and moths. *BMC Evol. Biol.*, 16(1): 118.

Aykiz, Ding XH, Fu KY, Tursun A, He J, Zhu XH, Ban XL, Gulixiati, Ding AQ, Guo WC, 2017. Comparison of biological characteristics of 3 geographical populations and developmental stages of *Ostrinia furnacalis*. *Xinjiang Agric. Sci.*, 54(10): 1863 – 1874. [阿依克孜，丁新华，付开赟，吐尔逊·阿合买提，何江，朱晓华，班小莉，古丽夏提，丁爱琴，郭文超，2017. 新疆玉米产区三个玉米螟地理种群发育起点、有效积温测定与比较研究. 新疆农业科学，54(10): 1863 – 1874]

Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ, Werren JH, 2006a. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 23(2): 437 – 449.

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH, 2006b. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(11): 7098 – 7110.

Baldo L, Werren JH, 2007. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on *wsp*: spurious lineages and discordance with MLST. *Curr. Microbiol.*, 55(1): 81 – 87.

Duplouy A, Couchoux C, Hanski I, van Nouhuys S, 2015. *Wolbachia* infection in a natural parasitoid wasp population. *PLoS ONE*, 10(8): e0134843.

Fenn K, Blaxter M, 2006. *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends Parasitol.*, 22(2): 60 – 65.

Fleury F, Vavre F, Ris N, Fouillet P, Boulétreau M, 2000. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology*, 121(5): 493 – 500.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH, 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.*, 281(2): 215 – 220.

Jäckel R, Mora D, Dobler S, 2013. Evidence for selective sweeps by *Wolbachia* infections: phylogeny of *Altica* leaf beetles and their reproductive parasites. *Mol. Ecol.*, 22(16): 4241 – 4255.

Kageyama D, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 1998. Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, 81(3): 311 – 316.

Kageyama D, Nishimura G, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 2002. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Heredity*, 88(6): 444 – 449.

Kageyama D, Nishimura G, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 2003a. Two kinds of sex ratio distorters in a moth, *Ostrinia scapulalis*. *Genome*, 46(6): 974 – 982.

Kageyama D, Nishimura G, Ohno S, Takanashi T, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 2004. *Wolbachia* infection and an all-female trait in *Ostrinia orientalis* and *Ostrinia zaguliaevi*. *Entomol. Exp. Appl.*, 111(1): 79 – 83.

Kageyama D, Ohno S, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 2003b. Sexual mosaics induced by tetracycline treatment in the *Wolbachia*-infected adzuki

bean borer, *Ostrinia scapulalis*. *Genome*, 46(6): 983 – 989.

Koehncke A, Telschow A, Werren JH, Hammerstein P, 2009. Life and death of an influential passenger: *Wolbachia* and the evolution of CI-modifiers by their hosts. *PLoS ONE*, 4(2): e4425.

Li J, Wang ZY, Bourguet D, He KL, 2013. *Wolbachia* infection in populations of *Ostrinia furnacalis*: diversity, prevalence, phylogeny and evidence for horizontal transmission. *J. Integr. Agr.*, 12(2): 283 – 295.

Lis A, Maryańska-Nadachowska AA, Kajtoch L, 2015. Relations of *Wolbachia* infection with phylogeography of *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) populations within and beyond the Carpathian contact zone. *Microb. Ecol.*, 70(2): 509 – 521.

Lv X, Zhang W, Hu CH, Dong ST, Bai P, 2005. Study on the integrated evaluation of the advantages of climatic ecological factors in maize-growing regions. *Arid Zone Res.*, 22(3): 387 – 390. [吕新, 张伟, 胡昌浩, 董树亭, 白萍, 2005. 玉米种植区气候生态因素优势综合评价研究. 干旱区研究, 22(3): 387 – 390]

Munoz AG, Baxter SW, Linares M, Jiggins CD, 2011. Deep mitochondrial divergence within a *Heliconius* butterfly species is not explained by cryptic speciation or endosymbiotic bacteria. *BMC Evol. Biol.*, 11(1): 358.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(7): 2699 – 2702.

Ritter S, Michalski SG, Settele J, Wiemers M, Fric ZF, Sielezniew M, Šašić M, Rozier Y, Durka W, 2013. *Wolbachia* infections mimic cryptic speciation in two parasitic butterfly species, *Phengaris teleius* and *P. nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae). *PLoS ONE*, 8(11): e78107.

Sakamoto H, Kageyama D, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 2007. Sex-specific death in the Asian corn borer moth (*Ostrinia furnacalis*) infected with *Wolbachia* occurs across larval development. *Genome*, 50(7): 645 – 652.

Simões PM, Mialdea G, Reiss D, Sagot MF, Charlat S, 2011. *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. *Mol. Ecol. Res.*, 11: 567 – 572.

Smith MA1, Bertrand C, Crosby K, Eveleigh ES, Fernandez-Triana J, Fisher BL, Gibbs J, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hind K, Hrcek J, Huang DW, Janda M, Janzen DH, Li Y, Miller SE, Packer L, Quicke D, Ratnasingham S, Rodriguez J, Rougerie R, Shaw MR, Sheffield C, Stahlhut JK, Steinke D, Whitfield J, Wood M, Zhou X, 2012. *Wolbachia* and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. *PLoS ONE*, 7(5): e36514.

van Meer MM, Witteveldt J, Stouthamer R, 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol. Biol.*, 8(3): 399 – 408.

Wang YX, 2002. Spatial differentiation and variety of the macro ecology in Xinjiang. *Arid Land Geogr.*, 25(1): 4 – 9. [王永兴, 2002. 新疆宏观生态的空间分异与变化. 干旱区地理, 25(1): 4 – 9]

Wang YZ, Kim KS, Guo WQ, Li QY, Zhang YY, Wang ZY, Coates BS, 2017. Introgression between divergent corn borer species in a region of sympatry: implications on the evolution and adaptation of pest arthropods. *Mol. Ecol.*, 26(24): 6892 – 6907.

Weinert LA, Araujo-Jnr EV, Ahmed MZ, Welch JJ, 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc. Biol. Sci.*, 282(1807): 20150249.

Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(10): 741 – 751.

Werren JH, Guo L, Windsor DW, 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 262(1364): 197 – 204.

Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 261(1360): 55 – 63.

Yang XH, Zhu DH, Liu Z, Zhao L, Su CY, 2013. High levels of multiple infections, recombination and horizontal transmission of *Wolbachia* in the *Andricus mukaigawae* (Hymenoptera: Cynipidae) communities. *PLoS ONE*, 8(11): e78970.

Zhang YK, Ding XL, Zhang KJ, Hong XY, 2013. *Wolbachia* play an important role in affecting mtDNA variation of *Tetranychus truncatus* (Trombidiformes: Tetranychidae). *Environ. Entomol.*, 42(6): 1240 – 1245.

Zhou DR, Wang YS, Li WD, 1988. Studies on the identification of the dominant corn borer species in China. *Acta Phytophyl. Sin.*, 15(3): 145 – 152. [周大荣, 王蕴生, 李文德, 1988. 我国玉米螟优势种的研究. 植物保护学报, 15(3): 145 – 152]

Zhou WG, Rousset F, O'Neill S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. Biol. Sci.*, 265(1395): 509 – 515.

Zhou XG, Fu JY, Liu SA, Mao TF, Xiao Q, Chen XX, 2016. Molecular detection and sequence analysis of *Wolbachia* strains in *Ectropis obliqua* and *Ectropis grisescens* (Lepidoptera: Geometridae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(4): 782 – 792. [周孝贵, 付建玉, 刘守安, 毛腾飞, 肖强, 陈学新, 2016. 茶尺蠖和灰茶尺蠖内共生菌 *Wolbachia* 的分子检测及序列分析. 应用昆虫学报, 53(4): 782 – 792]

Zug R, Hammerstein P, 2015. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 90(1): 89 – 111.

(责任编辑: 马丽萍)